

## 马槟榔甜味蛋白的研究 II. 甜蛋白 II 和甜蛋白 I 的比较\*

胡 忠 彭丽萍 何 敏

(中国科学院昆明植物研究所)

**摘要** 从马槟榔 (*Capparis masakai* Lévl.) 种子分离鉴定了二种甜蛋白: 甜蛋白 I (mabinlin I 或 Ma I) 分子量 MW11600, 等电点 pI 11.8; 甜蛋白 II (mabinlin II 或 Ma II) MW 10400, pI 11.3。另一组分 mabinlin III MW10200, pI 11.8, 可能是提取过程产物。Ma II 有 84 个氨基酸残基, 比 Ma I 少 15 个。它们有 80 个氨基酸残基是共同的, 都是缺丝氨酸和蛋氨酸的单一多肽链。Ma II 还缺赖氨酸和酪氨酸。测不出有自由 SH 基。在 8 M 尿素中用巯基乙醇还原处理, 两种甜蛋白分子都可转变为二聚体而失去甜味。

自去壳脱脂的种子干粉中提取 Ma I 和 Ma II 的得率依所用溶剂和提取条件而异。用 50% 丙酮水溶液提取, 继用 CM-纤维素分离, 甜蛋白的得率达 13%。用水或 0.1 N pH 6.2 磷酸缓冲液提取, 得率低于 1%。

**关键词** 马槟榔; 甜味蛋白

我们曾报告马槟榔 (*Capparis masakai* Lévl.) 种子引起持久性甜味的物质是一种碱性蛋白, 称马槟榔甜蛋白 (mabinlin) [2]。今对提取和分离甜蛋白的方法作了改进, 证明甜蛋白是马槟榔种子的主要蛋白成分, 提制的产率可达脱脂干种仁的 13%。除了前曾报道的主要甜蛋白组分 I (mabinlin I, 略写 Ma I) 以外, 尚分离到甜蛋白组分 II (mabinlin II, 略写 Ma II)。对它们的特性作了分析比较, 从而为进一步认识其甜味的决定因素和它们的相互关系提供线索。

## 材 料 和 方 法

**1. 材料** 新鲜的成熟马槟榔果实用塑料布包扎, 在室温下放置 6 天, 待果肉变软, 剥离出种子, 阴干, 存放于 5℃ 冰箱中, 存放期二年。使用时将种子去壳、粉碎, 种子粉末用石油醚 (沸点 30—60℃) 浸提脱脂, 干种子含油量为 30%。脱脂种子干粉于 5℃ 存放备用。

### 2. 甜蛋白的提取和分离

除试验说明外, 均采用丙酮水溶液提取法。每克脱脂干粉加 50% 丙酮水溶液 10—20 毫升, 在室温下快速搅拌提取 5 分钟, 离心去残渣, 向提取液中滴加 1 N 氢氧化钠至试纸检查 pH 10 左右, 即发生沉淀, 将沉淀离心分离出, 加适量水, 用 1 N 盐酸调 pH 6 左右使蛋白溶解, 该溶液供羧甲基纤维素柱层析分离。

本文于 1984 年 5 月 7 日收到。

\* 本研究项目受国家科委资助。

羧甲基纤维素 CM-52 (Whatman 产品) Na 型悬于蒸馏水中装柱。样品液直接上柱, 用蒸馏水洗到流出液 280nm 无吸收, 然后用 0.2N, 0.45N 和 0.8N 氯化钠溶液顺序分步洗脱, 紫外检测器 280nm 检测, 收集各蛋白质组分。各部分用 Visking 透析袋在室温下对蒸馏水透析脱盐, 或用 Diaflo YM-10 超滤膜超滤脱盐, 浓缩, 经冰冻干燥后于 5℃ 冰箱中保存。

### 3. 电泳方法

甜蛋白的鉴定和分子量测定主要用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳方法, 采用 Laemmli (1970) 的 Tris-HCl 和 Tris-甘氨酸缓冲系统<sup>[5]</sup>, 胶浓度 15%, 用作分子量标准的蛋白质组为 Bio Rad 产品, 共 6 种蛋白, 分子量范围为  $10^4$ — $10^5$ , 见图 4。

聚丙烯酰胺梯度电泳方法参见文献<sup>[1]</sup>。但用酸性电泳系统, 分离胶 pH 4.3, 电极缓冲液为  $\beta$ -丙氨酸醋酸溶液, pH 4.5<sup>[8]</sup>。样品液不加任何变性剂。电泳在 8—10℃ 进行, 恒压 150 伏, 电泳 16 小时至电泳电流接近零。用作分子量标准的蛋白质为核糖核酸酶 (MW 13500) 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (MW 21500)。

### 4. 光谱测定

甜蛋白用 0.1N pH 4.5 醋酸钠缓冲液配制, 浓度 1 mg/ml 左右, 在岛津 UV210A 紫外分光光度计上测定紫外光谱, 并测出  $E_{280}^{1\%}$  值。同样溶液用日立 850 荧光分光光度计测出荧光光谱, 激发光波长 280nm 和 295nm。

### 5. 氨基酸分析

按常规 6N 盐酸水解程序, 于日立 835-50 型氨基酸自动分析仪测定。蛋白质中色氨酸含量按 Spies (1967) 方法, 经链霉菌蛋白酶水解, 用二甲基氨基苯甲醛 (DAB) 比色测定<sup>[9]</sup>。在由氨基酸含量推算氨基酸残基数时, 由于甜蛋白不含甲硫氨酸, 人为选定丙氨酸残基数为 7, 这样推算出的分子量与电泳测定的分子量基本相符。

### 6. 巯基测定和双硫键还原裂解

蛋白质中 SH 基的测定按 Ellman (1959) 方法<sup>[4]</sup>, 8mg DTNB 溶于 100ml 0.1N 磷酸氢二钠溶液 (pH~8), 蛋白质水溶液与 DTNB 溶液以 1:1 体积混合, 在 2 小时内于 412 nm 处测定吸收值, 计算出 SH 基浓度。

蛋白质的双硫键还原裂解反应按 Needleman 引述的 Crestfield 等人 (1963) 的程序<sup>[7]</sup>。在本试验中, 还原裂解反应产物通过 Sephadex G25 柱, 用蒸馏水洗脱, 除去还原剂巯基乙醇和尿素, 分出蛋白组分, 再经 CM-纤维素柱层析纯化, 脱盐后供电泳分析。

## 结 果 与 分 析

### 1. 甜蛋白的提取和分离

用丙酮水溶液提取和用羧甲基纤维素柱层析分离甜蛋白能得到良好效果。图 1 示用 SDS-PAGE 鉴定出马槟榔种子有 6 个显见的蛋白质成分, 按分子量由大到小为 g, a, f, b, d, c。组分 g 当用丙酮水溶液提取时即可排除。其他 5 个组分用羧甲基纤维

素柱层析得到很好分离(图2)。其中,由0.45*N*氯化钠洗脱的组分c具有甜味,称为甜蛋白 II (Ma II),等电点为11.3〔2〕。由0.8*N*氯化钠洗脱所得组分d称为甜蛋白 I (Ma I),前曾报道,等电点11.8〔2〕。二者的甜味性质和强度相同。由100克脱脂种子干粉得 Ma I 8.9克, Ma II 1.4克,总得率为10.3%,这远远超过以前采用的用水提取和用硫酸铵分部沉淀法的得率。如果50%丙酮水溶液的甜蛋白提取液不调 pH 使蛋白沉淀,直接上 CM-纤维素分离,则甜蛋白的得率可达13% (表1)。

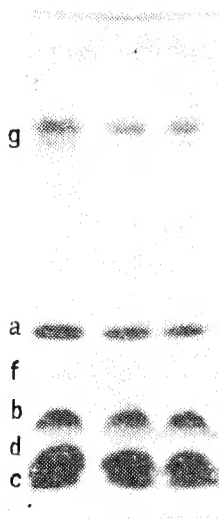
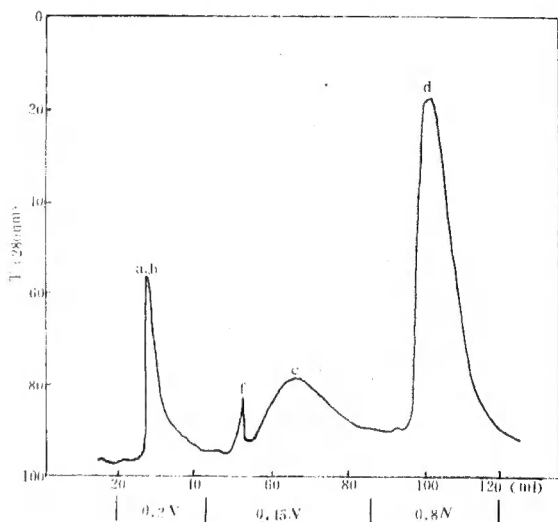


图1 马槟榔种子蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。显示a、b、c、d、f五个组分。甜蛋白Ma II (c), Ma I (d)。

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of seed protein. Five components were showed, sweet protein Ma II (c), Ma I (d).



氯化钠洗脱液浓度和体积 Elution volume of NaCl solution

图2 马槟榔种子蛋白在CM-纤维素柱层析分离的洗脱曲线。组分C为Ma II, 组分d为Ma I。

Fig. 2 Chromatography of seed protein on CM-cellulose column. c: Sweet protein Ma II, d: Ma I.

## 2. 提取和分部条件对甜蛋白产率和组成的影响

由表1各项试验结果,在常温下用水或用 pH 6.2 的缓冲液提取甜蛋白,得率很低,仅为1%。在 pH 2 酸性条件下提取,或用10%甘油水溶液提取,或用较高浓度的硫酸铵溶液提取,得率提高到5%。用50%丙酮水溶液提取,得率高达13%。

用不同溶剂提取,甜蛋白中 Ma I 和 Ma II 的相对量也不同。表1 No. 1—3 组试验用缓冲液、稀盐酸和甘油水溶液提取时, Ma I / Ma II 比值小于2。而 No. 5, 6 试验组用丙酮水溶液提取, Ma I / Ma II 比值大于6。

图3试验表明,脱脂干粉在下述二种提取条件下,提取液中有另一甜蛋白组分 III (Ma III): 将完好的去壳种子在常温下用水浸泡4天的浸出液;用甘油提取脱脂干粉,再将提取液溶于水。以上提出液的 SDS-PAGE 图上都有 d 和 e 二条带(图3—3, 4) d 条为 Ma I, e 带相近于 c 带。用 CM-纤维素柱层析, d 和 e 组分不为 0.45*N* NaCl 洗脱,而为 0.8*N* NaCl 洗脱,说明它们等电点相似,因此 e 与 c (Ma II) 分子量相近,

表 1 不同提取方法对甜蛋白产率和组成的影响

Table 1 Yields of sweet protein with different extraction and fractionation methods from de-lipid seed powder

试验编号 Test No	提取溶剂和分部方法 Solvent and fractionation	产量Yield (mg/g)*		总产率Total Yield (%)
		Ma I	Ma II	
1	pH6.2, 0.1N 磷酸缓冲液 phosphate buffer	1.0	4.8	0.58
2	pH 2 盐酸溶液 HCl solution	34.8	18.3	5.31
3	10% 甘油水溶液 aqueous glycerol	32.8	19.5	5.23
4	20% 饱和度硫酸铵提取 60% 饱和度硫酸铵沉淀 Extracting with 20% saturation and precipitating with 60% saturation of ammonium sulphate	44.7	10.7	5.54
5	50% 丙酮水溶液 aqueous acetone	124.0	15.3	13.93
6	50% 丙酮水溶液提取, pH10沉淀 Extracting with 50% aqueous acetone and then precipitating at pH 10	89.0	14.0	10.30

\* 注: 以 1 克种子脱脂干粉加20ml 提取溶剂提取, 经CM-纤维素柱层析分离所得甜蛋白mg数。  
\* Note: Sweet protein (mg) was extracted with 20 ml of solvent and separated through CM-cellulose column.

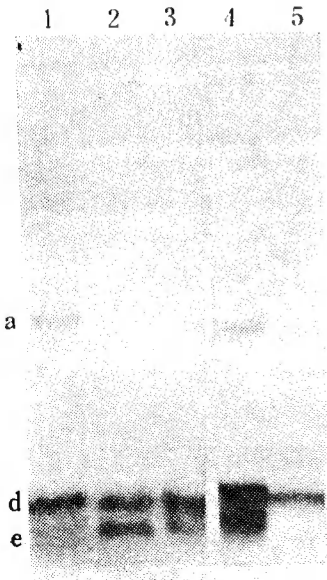


图 3 马槟榔甜蛋白 Ma I 和 Ma II 的SDS-PAGE鉴定

图中1, 5: 去壳种子于 5℃经水浸泡12小时, 用醋酸酒精 (1:3) 固定24小时, 脱脂, 水提取, 显示 d 带 (Ma I)。  
3: 脱脂干粉用甘油提取, 提取液与水混合, 显示 d 带 (Ma I) 和 e 带 (Ma II)。  
4: 去壳种子用水浸泡 4 天, 水浸出液显示 d 带 (Ma I) 和 e 带 (Ma II)。  
2: 由 4 项种子的水浸出液通过羧甲基纤维素柱层析, 0.8N NaCl洗脱组分, 显示 d 和 e 带 (Ma I 和Ma II)。

Fig. 3 Identification of sweet protein Ma I and Ma II on SDS-PAGE. 1 and 5 : In extract from the de-lipid seed powder after seed being soaked in water for 12 h at 5℃ and then in the mixture of acetate and ethanal (1 : 3) for 24 h. band d (Ma I) was showed. 3 : In extract from de-lipid powder with aqueous glycerol, band d (Ma I) and e (Ma II) were showed. 4 : In extract from seeds with water for 4 days, band d and e were showed. 2 : In the 0.8 N NaCl elution fraction on CM-cellulose column of the extract mentioned in 4, bands d and e (Ma I and Ma II) were showed.

但等电点不同，称 e 为 MaⅢ。如果去壳种子在 8℃左右浸泡 12 小时，用酒精醋酸（3：1）固定液固定 24 小时，其脱脂干粉用水提取就只能得到 MaⅠ（图 3—1,5）。这说明 e 组分是与提取过程有关，但其来源尚未确定。

3. 分子量

用 SDS-PAGE 测定分子量结果（图 4），甜蛋白 MaⅠ 分子量为 11600，MaⅡ 为 10400，MaⅢ 为 10200。由氨基酸组成分析推算结果（表 2），MaⅠ 为 11611，MaⅡ 为 9980。以上二种方法测定结果相近。用 Sephadex G50 凝胶过滤法，MaⅠ 和 MaⅡ 难以清晰分离，但仍确定 MaⅠ 分子量大于 MaⅡ。用聚丙烯酰胺梯度电泳测定结果（图 7），MaⅡ 相近于 SDS-PAGE 法测定值，但 MaⅠ 的测定值偏小，反而小于 MaⅡ，可能是该法测定中仍不能消除蛋白质等电点对迁移率的影响，导致 MaⅠ 迁移率偏大。

从以上不同方法测定结果，虽略有差别，但可以认为，甜蛋白分子均为单链而无亚基结构。

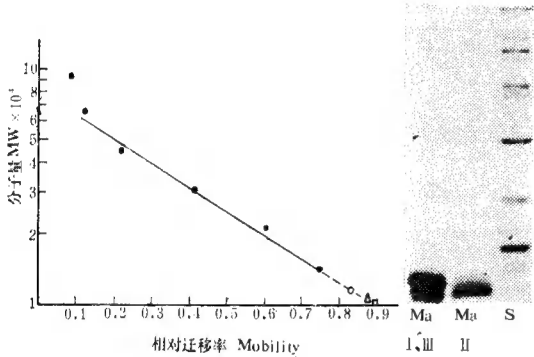


图 4 马槟榔甜蛋白组分 MaⅠ、MaⅡ、MaⅢ 的分子量用 SDS-PAGE 法测定。

Fig. 4 Determination of molecular weight of MaⅠ, MaⅡ and MaⅢ in SDS-PAGE. Standard proteins S: Lysozyme (14400), Soybean Trypsin Inhibitor (21500), Carbonic Anhydrase (31000), Ovalbumin (45000), BSA (66200), Phosphorylase B (92000). Sweet protein: MaⅠ (○, 11600), MaⅡ (△10400), MaⅢ (□, 10200).

4. 光谱特性

甜蛋白 MaⅠ 和 MaⅡ 的紫外光谱明显不同（图 5）。MaⅡ 主要吸收峰在 280 nm，此外在 288.5nm 和 274.5nm 有两个脊，明显为色氨酸的特征紫外光谱；此外在 260nm 左右也可见苯丙氨酸吸收。以上与 MaⅡ 的氨基酸组成有苯丙氨酸和色氨酸而无酪氨酸一致（表 2）。MaⅡ 的  $E_{280}^{1\%} = 8.31$ 。甜蛋白 MaⅠ 紫外光谱可见酪氨酸和苯丙氨酸吸收，主峰 278 nm， $E_{280}^{1\%} = 6.55$ ，未见有明显的色氨酸吸收（图 5），虽然 MaⅠ 也有色氨酸残基（表 2）。

MaⅠ 和 MaⅡ 在 280nm 激发光的荧光光谱均显示色氨酸的特征荧光（峰值 355nm），MaⅠ 的荧光光谱也有酪氨酸荧光（峰值 300nm），但很弱。显然，酪氨酸吸收的光能传给色氨酸而呈现色氨酸荧光<sup>[6]</sup>。荧光光谱中峰值 280 nm 的吸收峰可能是 Ragleigh 散射光。

5. 氨基酸组成

由表 2 测定结果，MaⅡ 比 MaⅠ 减少了 19 个氨基酸残基，即：Pro[6]，Lys[2]，Gly[2]，Val[2]，Arg[2]，His[1]，Thr[1]，Tyr[2]，Leu[1]。因

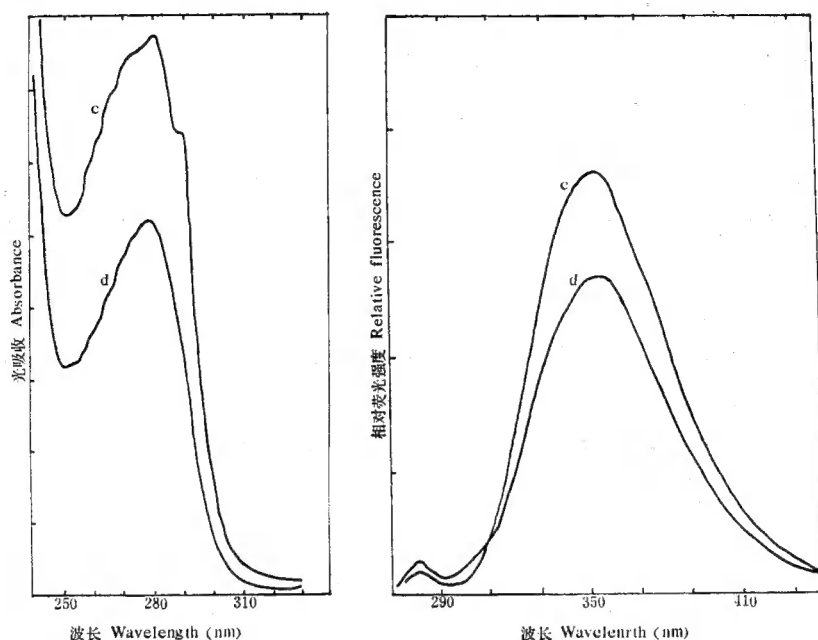


图5 马槟榔甜蛋白的紫外吸收光谱和荧光光谱。pH 4.5 醋酸缓冲液, 曲线C为 Ma II, d 为 Ma I。E<sub>280</sub><sup>1%</sup>: Ma I 6.55, Ma II 8.31。荧光激发光波长280nm。

Fig. 5 UV spectrum and fluorescence spectrum of the sweet protein. In pH 4.5 acetate buffer, Ma I (d), E<sub>280</sub><sup>1%</sup> = 6.55, Ma II (c), E<sub>280</sub><sup>1%</sup> = 8.31. The exciting light wavelength of fluorescence was 280nm.

此, Ma II 没有 Thr, Lys 和 Tyr。但 Ma II 比 Ma I 多 Phe [1], Asp [2] 和 Ile [1]。这二个甜蛋白都没有甲硫氨酸和丝氨酸。它们绝大部分即80个氨基酸残基是共同的, 其中最多的是 Arg, Glx 和 Pro。

### 6. SH 基和双硫键

用 DNTB 比色法没有检出二个甜蛋白有自由 SH 基 ( $<10^{-3}$  M/M), 即使在变性剂 8 M 尿素或 0.4% SDS 存在下也是如此。

在 8 M 尿素存在下用巯基乙醇进行还原裂解反应, 反应产物通过 Sephadex G 25 除去变性剂和还原剂时, 由 Ma I 得到一个蛋白质洗脱峰 d' (见图 6), 该组分在羧甲基纤维素柱上为 0.2 N NaCl 所洗脱, 其紫外光谱完全同于 Ma I, 在 SDS-PAGE 图上与 Ma I 相重合, 即分子量约为  $10^4$ , 但它在聚丙烯酰胺梯度电泳图上 (见图 7), 亦即在不解离为亚基的情况下, 分子量约为  $1.8 \times 10^4$ , 为 Ma I 的二倍, 是二聚体。Ma II 经还原裂解处理后通过 Sephadex G 25 得到二个洗脱峰 C<sub>1</sub>' 和 C<sub>2</sub>' (图 6), 在 CM-纤维素柱上, C<sub>1</sub>' 为 0.2 N NaCl 洗脱, C<sub>2</sub>' 为 0.4 N NaCl 洗脱, 它们的紫外光谱完全同于 Ma I, 在 SDS-PAGE 图上都是分子量为  $10^4$  的蛋白带, 但是在聚丙烯酰胺梯度电泳图上 (图 7), C<sub>2</sub>' 的分子量约为  $10^4$ , 与 Ma II 相同, 而 C<sub>1</sub>' 分子量约为  $2 \times 10^4$ , 为 Ma II 的二倍。显然, 部分 Ma II 成为二聚体。Ma I 和 Ma II 经还原裂解处理后的产物均无甜味。

表 2 马槟榔甜蛋白MaⅠ和MaⅡ的氨基酸组成  
Table 2 Amino acid composition of sweet protein MaⅠ and MaⅡ

氨基酸种类 Amino acid	样品中氨基酸含量		每毫克样品氨基酸μM		氨基酸残基数 <sup>1)</sup>	
	Content (%)		Content(μM) per mg		Number of amino acid residues	
	MaⅠ	MaⅡ	MaⅠ	MaⅡ	MaⅠ	MaⅡ
Asp	4.03	6.63	0.31	0.50	4.8(5)	6.5(7)
Thr	0.72	0	0.06	0	0.9(1)	0(0)
Ser	0.25	0.13	0.02	0.01	0.4(0)	0.2(0)
Glu	18.29	19.68	1.12	1.34	17.8(18)	17.4(18)
Gly	2.19	1.88	0.29	0.25	4.6(5)	3.2(3)
Ala	3.91	4.83	0.44	0.54	7.0(7)	7.0(7)
Cys	4.03	4.57	0.33	0.38	5.3(5)	4.9(5)
Val	3.34	2.91	0.29	0.24	4.5(5)	3.1(3)
Met	0.30	0	0.02	0	0.3(0)	0(0)
Ile	2.53	3.95	0.19	0.30	3.1(3)	3.9(4)
Leu	7.13	8.31	0.54	0.63	8.7(9)	8.2(8)
Tyr	2.07	0.37	0.12	0.02	1.8(2)	0.3(0)
Phe	3.22	4.64	0.20	0.28	3.1(3)	3.6(4)
Lys	1.96	0.39	0.13	0.03	2.1(2)	0.3(0)
His	2.65	1.71	0.17	0.11	2.7(3)	1.5(2)
Arg	17.37	18.13	1.00	1.04	15.9(16)	13.5(14)
Pro	10.47	6.75	0.91	0.59	14.4(14)	7.6(8)
Try	1.50	1.87	0.07	0.09	1.2(1)	1.2(1)
NH <sub>3</sub>	0.87	1.83	0.57	1.08	9.1(9)	13.8(14)
合计Total	86.93	88.48	—	—	99	84
分子量MW <sup>2)</sup>	—	—	—	—	11611	9980

注：1) 以Ala的残基数7.0为基数计算。2) 根据氨基酸残基数计算，NH<sub>3</sub>以酰胺处理。  
Notes: 1) Calculated on basis of being 7 of Ala residues.  
2) Calculated on basis of amino acid residue number.

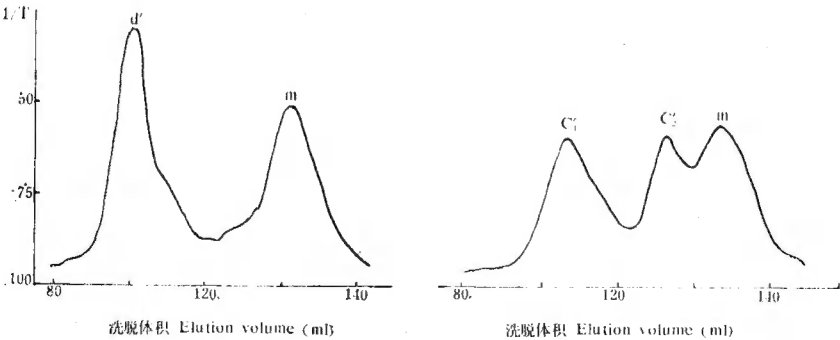


图 6 马槟榔甜蛋白经还原裂解处理的反应液经Sephadex G 25 柱的洗脱曲线。左：由甜蛋白MaⅠ得 d'。  
右：由MaⅡ得C<sub>1</sub>'和C<sub>2</sub>'二个蛋白组分。m为巯基乙醇吸收峰。  
Fig. 6 Gel filtration patterns of the reductive cleavage products of MaⅠ (left) and MaⅡ (right).  
Elution fraction d' was from MaⅠ, fractions C<sub>1</sub>' and C<sub>2</sub>' were from MaⅡ. Fraction m was β-mecraptoethanol.

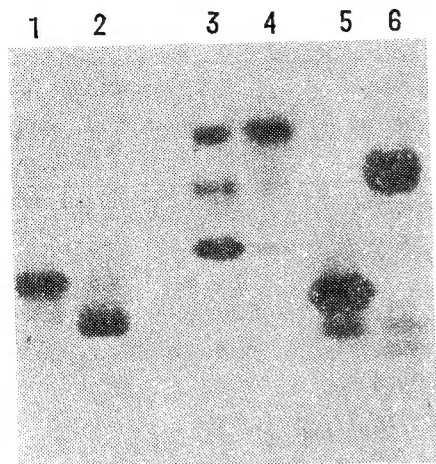


图 7 马槟榔甜蛋白聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳。图中 3:标准蛋白核糖核酸酶 (MW13500) 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (MW21500) 的混合物; 1. 甜蛋白 Ma I; 2. Ma I; 4、5:Ma I 经还原裂解处理的产物  $C_1'$  和  $C_2'$ ; 6, Ma I 经还原裂解处理的产物  $d'$  (见图 6)。  $C_1'$  和  $d'$  的分子量分别是 Ma I 和 Ma I 的二倍。

Fig. 7 Gradient -PAGE pattern of Sweet protein. 3: The mixture of standard proteins, ribonuclease (MW 13500), soybean trypsin inhibitor (MW 21500). 1: Ma I, 2: Ma I. 4, 5: The components  $c_1'$  and  $c_2'$  from Ma I respectively. 6: The  $d'$  from Ma I. (see Fig. 6) The  $c_1'$  and  $d'$  were double the molecular weight of the Ma I and Ma I respectively.

以上试验说明,天然马槟榔甜蛋白分子均为单链,分子内部的 5 个半胱氨酸残基至少形成二对双硫键,当经过还原裂解后除去变性剂和还原剂时,不能复原,而在二个分子间形成双硫键成为二聚体, Ma I 比 Ma II 更易发生这种现象。可以推论,分子内部的双硫键对甜味性质是重要的。

## 讨 论

从马槟榔种子可分离出二种甜蛋白成分: Ma I 分子量 11600, 等电点 11.8; Ma II 分子量 10400, 等电点 11.3。在提取过程中可能产生 Ma III, 分子量 10200, 等电点约 11.8。它们都是单链。比较氨基酸组成,推测 Ma II 是 Ma I 丢失一条富于脯氨酸的端肽链,经过修饰产生的。它们共同有由 80 个氨基酸残基组成的多肽链,这决定共有的甜味性质。该多肽链未能测出有自由 SH 基,而双硫键的存在对甜味是重要的。这些都与甜蛋白 thaumatin 类似,但马槟榔甜蛋白分子量只有 thaumatin 的一半左右<sup>[10]</sup>。与甜蛋白 monellin 分子量相近,但特性上差异较大<sup>[3]</sup>。

马槟榔甜蛋白在去壳种仁中含量高达 10% 以上,是种子蛋白的主要成分。甜蛋白的提取产率和二个甜蛋白的相对量因提取条件不同而显著不同,根据本试验结果,推论在提取过程中甜蛋白与细胞中某种成分形成不易溶于水的结合状态。甜蛋白在细胞中究竟以何种状态贮存于种子中,值得进一步研究。

根据本试验结果,我们前文<sup>[2]</sup>中的图 4 各组编号应与本文图 1 各色带相对应,按泳动距离由小到大为 g、a、f、b、c、d。前文中图 5 的 c 应为 b。

致谢:美国 Pennsylvania 大学 R. H. Cagan 教授寄来他们对甜蛋白 monellin 研究结果的一套复印本给我们参考,谨致谢意。



## 参 考 文 献

- [1] 张龙翔等编, 1981: 生化实验方法和技术, 第119—123页, 实验二十四。人民教育出版社。
- [2] 胡忠、何敏, 1983: 马槟榔甜蛋白的研究 I. 提取、纯化和某些特性。云南植物研究, 5: 207—212。
- [3] Cagan, R. H. and J. A. Morris, 1976: The sulfhydryl group of monellin, Its chemical reactivity and importance to the sweet taste. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 152: 635—640.
- [4] Ellman, G. C. 1959: Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70—77.
- [5] Laemmli, U. K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680—685.
- [6] Morton, R. A. 1975: *Biochemical Spectroscopy*, Vol. I. Adam Hilger, London.
- [7] Needleman, S. B. ed., 1975: *Protein sequence determination*. Springer-Verlag, P. 193.
- [8] Reisfeld, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams, 1962: Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195: 281.
- [9] Spies, J. R. 1967: Determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 39: 1412.
- [10] Van del Wel, H. and K. Loeve, 1972: Isolation and characterization of thaumatin I, II, the sweet-taste protein from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Eur. J. Biochem.* 31: 221—225.

## STUDIES ON MABINLIN, THE SWEET PROTEIN FROM SEEDS OF CAPPARIS MASAII

### II. COMPARISON OF MABINLIN I TO MABINLIN II

Hu Zhong, Peng Liping and He Min

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

**Abstract** Two components of sweet protein were separated and characterized: mabinlin I (Ma I), the major one, with MW of 11600 and isoelectric point pI of 11.8, and mabinlin II (Ma II) with MW of 10400 and pI of 11.3. Another component mabinlin III (Ma III) with MW of 10200 and pI of about 11.8 was found to be produced during the extraction. Ma II contains 84 amino acid residues that are fewer 15 amino acid residues than Ma I, of which 6 residues are Pro. These proteins are all single polypeptide chains lacking Ser and Met. 80 amino acid residues are common in Ma I and Ma II molecules in which Arg, Glx and Pro are dominant ones. No SH group was detected. After treatment of reductive cleavage with  $\beta$ -mercaptoethanol in 8 M urea, these protein molecules were transformed into dimers and lost the sweet nature.

The yield and the ratio of Ma I to Ma II extracted from the lipid-free

powder of decorticated seeds depended on the solvent used and the conditions of extraction. A highest yield of 13% was obtained in extraction with 50% aqueous solution of acetone and separation through CM-cellulose column chromatography. While extraction with water or 0.1M pH6.2 phosphate buffer the yield was less than 1% because of the less accessibility of the protein in combined state.

**Key words** *Capparis masaiikai*; Sweet protein